

## Sparfloxacin の痙攣誘発作用に関する研究

堀 誠治・嶋田基五郎・柴 孝也

吉田正樹・斎藤 篤・酒井 紀

東京慈恵会医科大学第二内科\*

近年多くのキノロン系抗菌薬が開発され、臨床の用に供されている。キノロン系抗菌薬はその副作用の一つとして痙攣誘発作用を有することが知られている。さらに、enoxacin (ENX) と非ステロイド系消炎薬の一つである fenbufen との併用時に痙攣が誘発されたという報告がある。そこで、sparfloxacin (SPFX) をはじめとする新キノロン系抗菌薬のγ-アミノ酪酸 (GABA) 受容体結合におよぼす影響を、非ステロイド系消炎薬の存在、非存在下に検討した。

SPFX の GABA 受容体結合阻害効果は弱いものであり、非ステロイド系消炎薬の共存によってもその阻害効果は増強されなかった。さらに、fenbufen の活性代謝産物である 4-biphenyl-acetate (5 nmol, 絶対量) とともに ENX をマウス脳室内に投与すると痙攣が誘発されたが、SPFX (絶対量 10 nmol まで) では痙攣の誘発を認めなかった。

以上の結果より、SPFX は非ステロイド系消炎薬の共存下でも痙攣誘発作用の弱い薬剤である可能性が示唆された。

**Key words** : ニューキノロン, Sparfloxacin, 痙攣, GABA 受容体結合

近年のキノロン系抗菌薬の開発には目覚ましいものがあり、多くの化合物が合成されている。特に、フッ素および piperazinyl 基を構造に導入することにより、抗菌スペクトルがグラム陽性球菌にまで拡がり、その使用量の増大をもたらしている。

キノロン系抗菌薬の母体である nalidixic acid (NA) が多彩な中枢神経に対する作用を有していることはよく知られており<sup>1)</sup>、その一つとして痙攣の報告があることはよく知られている<sup>2, 3)</sup>。さらに、pipemidic acid (PPA) を腎不全患者に投与した際に痙攣が誘発されたという報告がある<sup>4)</sup>。また、norfloxacin (NFLX) をはじめとする新キノロン系抗菌薬に関しても、NFLX<sup>5, 6)</sup>、enoxacin (ENX)<sup>7)</sup>、ciprofloxacin (CPFX)<sup>8)</sup> において、それぞれの単独投与で痙攣が誘発されたという報告がある。さらに、ENX と非ステロイド系消炎薬の一つである fenbufen との併用時に痙攣が誘発されたという報告<sup>9)</sup> がなされてより、本系薬による中枢神経毒性、とくにその痙攣誘発機序が注目されている。我々は、キノロン系抗菌薬の痙攣誘発機序の一つとして、中枢神経系において抑制性伝達物質と考えられているγ-アミノ酪酸 (GABA) の受容体への結合阻害を示してきた<sup>10)</sup>。

Sparfloxacin (SPFX) は、quinoline 環を母核と

する新しいキノロン系抗菌薬である。1 位に cyclopropyl 基、5 位に amino 基、6 位、8 位にフッ素、7 位に 3, 5-dimethyl piperazinyl 基を有している。本薬もキノロン系抗菌薬である以上、その中枢神経毒性発現の可能性が問題となる。そこで、今回我々は、SPFX の痙攣誘発作用の可能性について他の本系抗菌薬と比較検討した。

## I. 材料と方法

## 1) マウス脳シナプス膜の調製

ddY マウス (雄, 体重 20~25 g) を断頭後、脳をすばやく取り出し、0.32 M ショ糖液を用い 10% homogenate を作成した。その homogenate より、遠心分離により粗 mitochondria 画分を得、脳重量の 20 倍の 10 mM カリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) で低張処理した後、Zukin らの方法により粗シナプス膜を得た<sup>11)</sup>。さらに、粗シナプス膜を、120 mM NaCl を含む 10 mM カリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 5 回洗浄し、シナプス膜とした。シナプス膜は、適量のカリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁 (0.5 g/ml) し、-20℃にて保存した。

## 2) GABA 受容体結合の測定

測定に先立ち、シナプス膜を 2 回 10 mM カリウム・

\*〒105 東京都港区西新橋 3-25-8

Table 1.  $IC_{50}$  values of new quinolones

	$IC_{50}(M)$
Sparfloxacin	$9.1 \times 10^{-4}$
Norfloxacin	$1.4 \times 10^{-3}$
Enoxacin	$1.4 \times 10^{-4}$
Ofloxacin	$1.0 \times 10^{-3}$
Ciprofloxacin	$7.6 \times 10^{-5}$

Each value represents mean of two or three separate experiments.

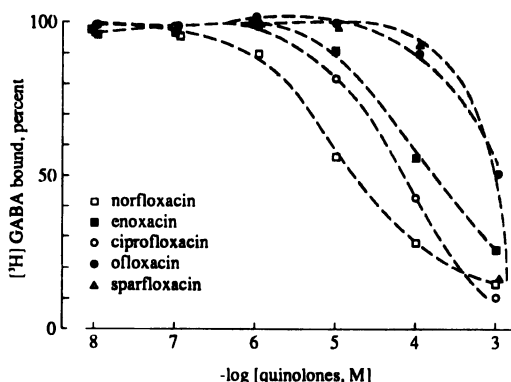


Fig. 1. Effect of new quinolones on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor binding

The receptor binding was determined as specific  $[^3H]$ GABA binding in mouse synaptic membranes. Membranes were incubated with  $[^3H]$  GABA (5 nM, final concentration) and new quinolones in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min at 4 °C. Each point indicates mean of two or three separate experiments. The deviations in two or three experiments were within 11%, and those in duplicate were within 3%.

リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、測定に供した。10 mM カリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) 400  $\mu$ l 中にシナプス膜、 $[^3H]$  GABA (最終濃度 5 nM) およびキノロン系抗菌薬 (最終濃度  $10^{-8}$ ~ $10^{-3}$  M) を含む反応混液を非ステロイド系消炎薬の共存 (最終濃度  $10^{-4}$  M), 非共存下に 4 °C, 20 分反応させた。反応は、18000 g, 15 分遠心することにより停止した。上清を除去したのち、ペレット表面を素早く氷冷した脱イオン水で洗浄した。ペレットに存在する放射能を液体シンチレーションカウンターにより測定し、 $[^3H]$  GABA 結合量とした。

GABA 受容体結合は、 $[^3H]$  GABA のシナプス膜への特異的結合量として求めた。即ち、全結合量 (非標識 GABA 非存在下の結合量) より非特異的結合量 (1 mM 非標識 GABA 存在下の結合量) を差し引くことにより特異的結合を求めた<sup>12)</sup>。

非特異的結合は、全結合の  $22 \pm 3\%$  であり、各結合実験間における全結合量の標準偏差は、12%であった。

また、結果は薬剤非存在下の特異的結合量を 100 とした百分率で表示した。

### 3) マウス脳室内投与

ENX, SPFX を単独または 5 nmol の 4-biphenylacetate (BPA) とともにマウス側脳室内に中島の方法により無麻酔・非動下に投与した<sup>13)</sup>。一投与量に対し 5 匹のマウスを用い、痙攣が誘発されたマウスの百分率で表現した。

## II. 結 果

### 1) SPFX および新キノロン系抗菌薬の GABA 受容体結合に及ぼす影響

SPFX をはじめとし、新キノロン系抗菌薬の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。NFLX, CPFX, ENX は、濃度依存的に GABA 受容体結合を阻害したが、ofloxacin (OFLX), SPFX では、その高濃度においてのみ阻害効果が認められた (Fig. 1)。阻害曲線より算出した GABA 受容体結合に対する 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) を Table 1 に示す。

### 2) 非ステロイド系消炎薬存在下における SPFX をはじめとする新キノロン系抗菌薬の GABA 受容体結合に及ぼす影響

非ステロイド系消炎薬の存在下における SPFX をはじめとする新キノロン系抗菌薬の GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。Fenbufen の活性代謝産物である BPA の存在下 ( $10^{-4}$  M) では、NFLX, ENX, CPFX, OFLX の GABA 受容体結合阻害効果は著しく増強されたが、SPFX では、その増強効果は小さ

Table 2.  $IC_{50}$  values of new quinolones in the presense of NSAIDs

Quinolone	none	acetyl salicylate*	fenbufen*	indomethacin*	flurbiprofen*	BPA*
Sparfloxacin	$9.1 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-4}$	$5.2 \times 10^{-5}$
Enoxacin	$1.4 \times 10^{-4}$	$8.3 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-5}$	$5.3 \times 10^{-7}$	$3.3 \times 10^{-7}$	$1.1 \times 10^{-8}$
Norfloxacin	$1.4 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-7}$	$1.9 \times 10^{-7}$	$1.4 \times 10^{-8}$	$< 10^{-8}$
Ofloxacin	$1.0 \times 10^{-3}$	$7.6 \times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-5}$	$8.3 \times 10^{-7}$
Ciprofloxacin	$7.6 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-5}$	$3.0 \times 10^{-5}$

NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs

\*  $10^{-4}$ M (final concentration)

BPA: 4-biphenylacetate

Each value represents mean of two separate experiments.

かった。また、NFLX, ENX, OFLX および CPFX では、indomethacin, fenbufen 自身, flurbiprofen の共存によりそれらの GABA 受容体結合阻害効果は増強されたが、SPFX ではその増強効果は小さかった。一方、acetyl salicylate の共存では、新キノロン系抗菌薬の GABA 受容体結合阻害効果は増強されなかった (Fig. 2)。それらの  $IC_{50}$  値を Table 2 に示す。

### 3) マウス脳室内投与による痙攣誘発

ENX および SPFX を単独または BPA (絶対量 5 nmol) と同時に投与した。ENX および SPFX 単独では、10 nmol までは痙攣の誘発が見られなかった。一方、5 nmol の BPA を同時に投与すると、ENX では濃度依存的に痙攣が誘発されたが、SPFX では 10 nmol まで痙攣の誘発が認められなかった (Fig. 3)。

## Ⅲ. 考 察

従来よりキノロン系抗菌薬が中枢神経系に対する毒性を有することはよく知られており、本系薬にとって、中枢神経毒性は宿命的なものと考えられてきた<sup>14)</sup>。NA の大量投与<sup>1, 2)</sup>、腎不全患者における PPA の投与により痙攣が誘発されたという報告<sup>4)</sup>がある。新キノロン系抗菌薬の中では、NFLX, ENX, CPFX の投与により痙攣が誘発されたという報告がなされている<sup>5-8)</sup>。さらに、1986 年、わが国において、ENX と非ステロイド系消炎薬の一つである fenbufen との併用時に痙攣が誘発されたという報告<sup>9)</sup>がなされてより、その痙攣誘発機序が注目されている。我々は、キノロン系抗菌薬による痙攣発現機序の一つとして、中枢神経系において抑制性伝達物質と考えられている GABA の受容体結合に対する、本系薬による阻害を示してきた<sup>10)</sup>。

GABA は、中枢神経系において抑制性伝達物質と考えられており、GABA 作動性抑制性伝達の低下は脳内における興奮性を増大させ、痙攣を誘発するものと考え

られている<sup>15)</sup>。脳内 GABA 量を低下させるような条件下 (ビタミン B<sub>6</sub> 欠乏、高圧酸素呼吸時など) では、痙攣が誘発されることはよく知られている<sup>16, 17)</sup>。さらに、GABA 受容体結合を阻害するような条件下でも痙攣が誘発されることも報告されている<sup>15)</sup>。また、我々はセフェム系抗菌薬において、その痙攣発現機序として GABA 受容体結合阻害の関与を示してきた<sup>12)</sup>。

新しいキノロン系抗菌薬である SPFX の GABA 受容体結合におよぼす影響を検討した。本薬は、その高濃度で GABA 受容体結合を抑制するものの、その阻害効果は ENX, NFLX, CPFX よりは弱く、OFLX とほぼ同等のものであった。従って、この *in vitro* の結果より、SPFX の痙攣誘発の可能性は低いものと考えられる。

さらに、ENX と非ステロイド系消炎薬の一つである fenbufen との併用時に痙攣が誘発されたという報告がある<sup>9)</sup>ため、本薬においても非ステロイド系消炎薬との併用時の痙攣誘発作用が問題となるところである。そこで、非ステロイド系消炎薬共存下に本薬をはじめとする GABA 受容体結合に及ぼす影響を検討した。Fenbufen の活性代謝産物である BPA の共存下 ( $10^{-4}$ M) では、SPFX による GABA 受容体結合阻害効果は、若干増強 ( $IC_{50}$  値が約 20 分の 1 に低下) された。他のキノロン系抗菌薬では、BPA の共存により  $IC_{50}$  値が  $1/10^3 \sim 1/10^4$  に低下し (Fig. 2, Table 2), acetyl salicylate では、その共存によってもキノロン系抗菌薬の GABA 受容体結合の阻害効果に影響を与えなかった。このことより、SPFX は、非ステロイド系消炎薬共存下においても他のキノロン系抗菌薬に比し、その痙攣誘発作用は弱いものと考えられた。また、acetyl salicylate は、キノロン系抗菌薬との併用時において、安全な非ステロイド系消炎薬である可能性が示された。

SPFX および ENX を、BPA (5 nmol, 絶対量)

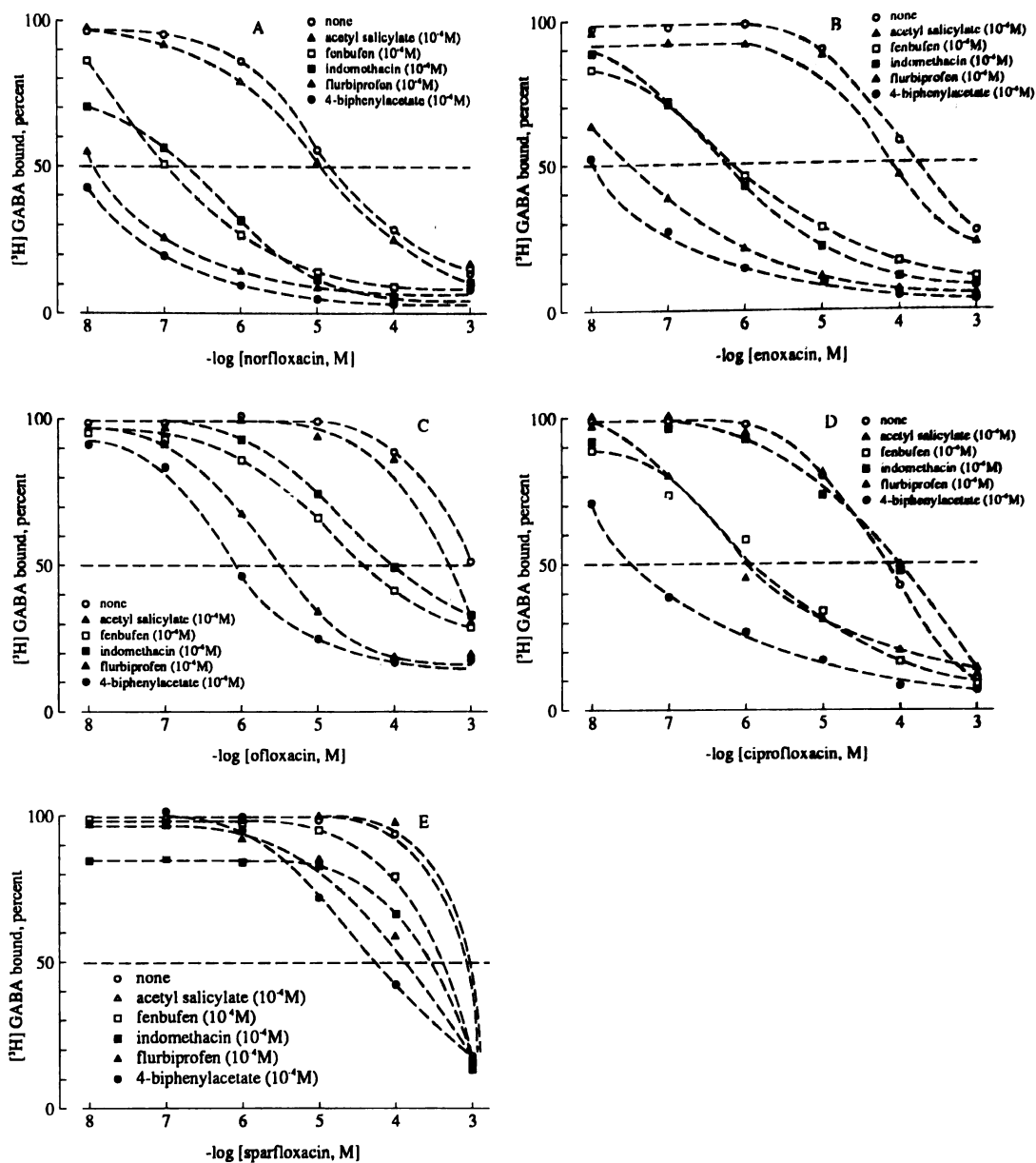


Fig. 2. Effect of norfloxacin (A), enoxacin (B), ofloxacin (C), ciprofloxacin (D) and sparfloxacin (E) on  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in the presence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

The receptor binding was determined as specific  $[^3\text{H}]$  GABA binding in mouse synaptic membranes. Membranes were incubated with  $[^3\text{H}]$  GABA (5 nM, final concentration), quinolones and NSAIDs ( $10^{-4}\text{M}$ ) in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . Each point indicates mean of two or three separate experiments. The deviations in two or three experiments were within 11%, and those in duplicate were within 3%.

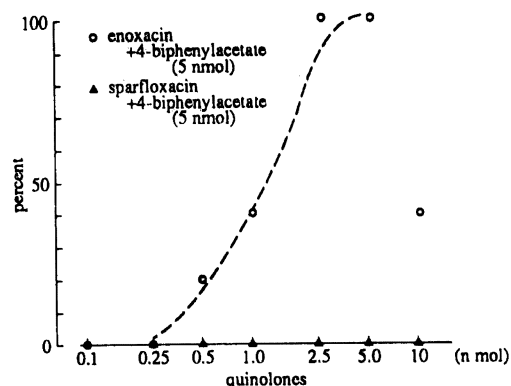


Fig. 3. Convulsant effect of concurrent intraventricular injection of enoxacin (○) and sparfloxacin (△) with 4-biphenylacetate (5 nmol, absolute amount) in mouse brain

Enoxacin or sparfloxacin dissolved in 1.2 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) with 4-biphenylacetate and 5  $\mu$ l of the solution was injected in mouse lateral ventricle according to the method of Nakajima. The absolute amounts of enoxacin and sparfloxacin injected in mouse lateral ventricles are shown in the figure, and that of 4-biphenylacetate was 5 nmol.

の共存下にマウス脳室内に投与し、*in vivo*における痙攣誘発作用を検討した。ENXでは濃度依存的に痙攣が誘発され、2.5 nmolでは100%のマウスに痙攣の発現をみた。一方、SPFXでは10 nmolまで痙攣の誘発をみなかった (Fig. 3) (10 nmol以上の投与は、pHの調整が困難なため実施できなかった)。さらに、ENX 10 nmolでは、痙攣誘発の頻度が低下した。このメカニズムについては不明であるが、ENXにおいて低濃度では興奮性に作用し、高濃度ではその興奮性が低下するいわゆる二相性に近い作用が*in vivo*では認められるのかもしれない。

以上の*in vivo*の結果からも、SPFXは非ステロイド系消炎薬との併用時にも痙攣誘発の可能性が低いと考えられた。

以上の成績より、SPFXは、類薬の中では痙攣誘発作用の弱い薬剤であろうことが示唆された。また、非ステロイド系消炎薬の併用時においても痙攣誘発作用の弱い可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Kucers A and McBenet N : The use of antibiotics. Lippincot Co., Philadelphia, 1988
- 2) Islam M A and Sreedharan T : Convulsions, hyperglycemia and glycosuria from overdose of nalidixic acid. J Am Med Assoc 192 : 1100~1101, 1985
- 3) Fraser A G and Harvower A D B : Convulsions and hyperglycemia associated with nalidixic acid. Brit Med J 2 : 1518, 1977
- 4) 上田 泰, 他 : Pipemidic acid に関する臨床的研究. Chemotherapy 23 : 2798~2870, 1975
- 5) Wolfson J S and Hooper D C : Norfloxacin ; A new targeted fluoroquinolone antimicrobial agent. Ann Int Med : 108, 238~251, 1988
- 6) Anastasio G D, Menscer D and Little J M : Norfloxacin and seizures. Ann Int Med 109 : 169~170, 1988
- 7) Simpson K J and Brodi M J : Convulsions related to enoxacin. Lancet ii : 161, 1985
- 8) Arcieri G, Griffith E, Gruenewalt G, Heyd A, O'Brien B, Decker N and August R : Ciprofloxacin ; an update on clinical experience. Am J Med 82 (Suppl 4A) : 381~394, 1987
- 9) 厚生省薬務局 : 医薬品副作用情報 (No. 81)。日本医事新報, No. 3263 : 101~102, 1982
- 10) 堀 誠治, 嶋田基五郎, 宮原 正, 栗岡 晋, 松田 誠 : キノロン系化学療法剤の痙攣発現機序に関する研究. 神経化学 26 : 178~180, 1987
- 11) Zukin S R, Young A B and Snyder S H : Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 71 : 4802~4807, 1974
- 12) Hori S, Kurioka S, Matsuda M and Shimada J : Inhibitory effect of cephalosporins on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor binding in rat synaptic membranes. Antimicrob Agents Chemother 27 : 650~651, 1985
- 13) 中島晋介 : Vitamin B<sub>6</sub>拮抗体による痙攣とその抑制効果について. 昭和医学会誌 32 : 9~17, 1984
- 14) 古賀 弘 : ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤の構造活性相関とドラッグデザイン. 化学の領域 (増

- 刊) 136 : 177~202, 1982
- 15) Meldrum B S : Epilepsy and  $\gamma$ -aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol* 17 : 1~36, 1975
- 16) 松田 誠 : ビタミン B<sub>6</sub>欠乏による痙攣発作の発現機序に関する研究。ビタミン 57 : 1~15, 1983
- 17) Hori S : Study on hyperbaric oxygen induced convulsion with particular reference to  $\gamma$ -aminobutyric acid in synaptosomes. *J Biochem* 91 : 443~448, 1982

## A STUDY ON CONVULSIVE EFFECTS OF SPARFLOXACIN WITH OR WITHOUT NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Seiji Hori, Jingoro Shimada, Kohya Shiba,  
Masaki Yoshida, Atsushi Saito and Osamu Sakai  
The Second Department of Internal Medicine,  
The Jikei University School of Medicine  
3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

Many new quinolones have been developed and used for the treatment of infectious diseases. Both old and new quinolones have been reported to have a convulsive activity as one of their side effects. Furthermore, it has been reported that concurrent therapy with enoxacin and fenbufen, one of the non-steroidal anti-inflammatory drugs, might be responsible for the induction of convulsions. Therefore, we studied the effect of sparfloxacin, a newly synthesized quinolone, and other new quinolones on receptor binding of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) with or without non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Intraventricular injection of sparfloxacin (up to 10 nmol) with 4-biphenylacetate (5 nmol) did not induce convulsions in mice, whereas intraventricular injection of enoxacin with 4-biphenylacetate induced convulsions in mice. Sparfloxacin itself hardly inhibited GABA receptor binding. Furthermore, the inhibitory activity of sparfloxacin in GABA receptor binding was not enhanced even in the presence of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

From these results, it was suggested that sparfloxacin might have little convulsant activity even in the presence of non-steroidal anti-inflammatory drugs.